

氏 名 李 孟玲
り もんりん

学 位 の 種 類 博士（医学）

学 位 記 番 号 富医薬博甲第 342 号

学位授与年月日 令和 2 年 9 月 28 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

教 育 部 名 富山大学大学院医学薬学教育部 博士課程
生命・臨床医学 専攻

学 位 論 文 題 目
Aluminum chloride causes 5-fluorouracil resistance in
hepatocellular carcinoma HepG2 cells
(塩化アルミニウムはHepG2細胞のフルオロウラシルに
よる細胞死に対する抵抗性を誘導する)

論文審査委員

(主査)	教 授	中川 崇
(副査)	教 授	安田 一朗
(副査)	教 授	井村 穰二
(副査)	教 授	北村 寛
(指導教員)	教 授	稲寺 秀邦

論 文 要 旨

論 文 題 目

**Aluminum chloride causes 5-fluorouracil resistance in
hepatocellular carcinoma HepG2 cells**

塩化アルミニウムはHepG2細胞のフルオロウラシルによる
細胞死に対する抵抗性を誘導する

氏 名 李 孟玲 Li Mengling

備考 ① 論文要旨は，2,000 字程度とする。

② A4 判とする。

〔目的〕

Hepatocellular carcinoma (HCC) is a common malignant tumor associated with high morbidity and mortality worldwide. Chemotherapy is one strategy for HCC treatment. However, chemoresistance remains a major obstacle for chemotherapeutic agents including 5-fluorouracil (5-FU). Aluminum (Al) is an environmental pollutant that plays a potential role in carcinogenesis, tumorigenesis and metastasis. At present, the effect of Al on chemoresistance remains unknown. In this study, we investigated the effects of aluminum chloride (AlCl_3) on 5-FU chemoresistance in HepG2 cells and attempted to elucidate the underlying mechanisms.

〔方法並びに成績〕

Cell viability was evaluated by MTT assay. Intracellular reactive oxygen species (ROS) levels were examined by flow cytometry and fluorescence microscope. Cell migration was determined by wound healing assay. The expressions of proteins associated with apoptosis, oxidative stress, cell cycle and cell migration were determined by Western Blot. Additionally, some cells were pretreated with different kinds of inhibitors, including an Erk inhibitor (U0126), a JNK inhibitor (JNK-IN-8) and a ROS scavenger (N-acetyl-cysteine), for 1 h after pretreatment with AlCl_3 (0-200 μM) before co-treatment with 5-FU (100 μM).

The results demonstrated that AlCl_3 prevented 5-FU-induced apoptosis in HepG2 cells by downregulating pro-apoptotic and upregulating anti-apoptotic proteins of the Bcl-2 family and by decreasing caspase-3 activation. AlCl_3 ameliorated 5-FU-induced oxidative stress. AlCl_3 attenuated 5-FU-induced apoptosis through Erk activation and reversed 5-FU-induced cell cycle arrest by down regulating p-Chk2^{Thr68} levels. In addition, AlCl_3 markedly increased the levels of proteins associated with cell migration, such as MMP-2 and MMP-9. Further investigation demonstrated that an Erk inhibitor (U0126) reversed the effect of AlCl_3 –induced decrease in

apoptosis, enhancement of cell cycle progression, promotion of cell migration, and attenuation of oxidative stress.




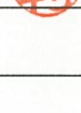
〔総括〕

The current study showed that AlCl_3 significantly induced chemoresistance to 5-FU in HepG2 cells. AlCl_3 pretreatment inhibited the effects of 5-FU through multiple pathways, such as cell viability, Erk pathway activation, cell cycle progression, and cell migration, and Erk activation seemed to play a critical role in the response to AlCl_3 exposure. Effects on these pathways may serve as the underlying mechanisms for AlCl_3 -mediated enhancement of 5-FU resistance. These findings may provide new insights into the mechanism of AlCl_3 exposure-related toxicity and contribute to improved understanding of the potential risks of daily Al exposure regarding chemoresistance to HCC therapy.

（386字）

様式 8

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

報 告 番 号	富医薬博甲第 号 富医薬博乙第 号	氏 名	李 孟玲
論文審査委員	職 名 (主査) 教授 (副査) 教授 (副査) 教授 (副査) 教授	氏 名 中川 崇 安田 一朗 井村 穰二 北村 寛	   
指導（紹介）教員	教授	稲寺 秀邦	
(論文題目 英文の場合は和訳, 日本語の場合は英訳を付記すること) Aluminum chloride causes 5-fluorouracil resistance in hepatocellular carcinoma HepG2 cells (塩化アルミニウムはHepG2細胞のフルオロウラシルによる細胞死に対する抵抗性を誘導する)			(判定) 合格
(論文審査の要旨) 【目的】 肝細胞がん (HCC) は、世界中で高い罹患率と死亡率を有する悪性腫瘍の一つである。化学療法はHCCに対する治療手段の1つであるが、5-フルオロウラシル (5-FU) を含む化学療法剤に対して抵抗性を持つことが臨床上的問題である。アルミニウムは、発がん、腫瘍形成、転移において重要な役割を果たす環境汚染物質として知られている。しかしながら、現在までにAlの化学療法抵抗性における役割は不明のままである。そこで、李孟玲氏は、ヒト肝臓由来細胞株であるHepG2細胞を用いて、塩化アルミニウム (AlCl ₃) が殺細胞性抗がん剤5-FUによる細胞死誘導にどのような影響を及ぼすか調べることにより、アルミニウムの化学療法抵抗性における役割と、抵抗性を引き起こすメカニズムを明らかにすることとした。			
【方法】 HepG2細胞に様々な濃度の5-FU、塩化アルミニウムを添加し、細胞生存率をMTTアッセイによって評価することでアルミニウムが5-FUによる細胞死誘導を抑制できるか調べた。Erk阻害剤 (U0126)、JNK阻害剤 (JNK-IN-8)、ROSスカベンジャー (N-アセチル-L-システイン) などのさまざまな種類の阻害剤で前処理した場合についても、同様に、MTTアッセイによる細胞生存率の評価を行った。また、細胞内活性酸素種			

(ROS) レベルの測定については、ROSと反応する蛍光色素DHEで染色し、その蛍光強度をフローサイトメトリーもしくは蛍光顕微鏡で調べた。細胞遊走能 (Cell migration) は、創傷治癒アッセイを用いて評価した。アポトーシス、酸化ストレス、細胞周期、細胞遊走に関連するタンパク質の発現は、ウェスタンブロットを用いて評価し、その定量はImage Studio Liteを用いたデンストメトリーで行った。

【結果】

塩化アルミニウムは、HepG2細胞における5-FU誘導性アポトーシスを抑制した。塩化アルミニウムはBcl-2ファミリーの抗アポトーシス性タンパク質の発現を上昇させ、カスパー-3の活性化を防止することで細胞死を抑制していた。また、5-FU誘導性アポトーシスにおけるROSの発生も塩化アルミニウム処理により低下していた。さらに、Chk2のThr68リン酸化レベルを低下させることによって5-FU処理で誘導される細胞周期停止を回避していた。塩化アルミニウムは、MMP-2やMMP-9などの細胞遊走に関連するタンパク質のレベルも著しく増加させていた。一方で、Erk阻害剤 (U0126) による処理は、アポトーシスの抑制、細胞周期停止の回避、細胞遊走の促進、および酸化ストレスの低下などの塩化アルミニウムによる5-FU誘導性アポトーシスにおける効果をすべてキャンセルした。つまり、Erkの活性化を介して塩化アルミニウムが5-FU誘導性アポトーシスを抑制していると考えられた。

【総括】

本研究において李孟玲氏は、塩化アルミニウムをヒト肝臓由来細胞株であるHepG2細胞に暴露することで、殺細胞性抗がん剤5-FUによって誘導されるアポトーシスが抑制されることを見出した。さらに、塩化アルミニウムによる細胞死抑制メカニズムには、Erkの活性化、さらにはその下流に位置する細胞周期停止の回避、細胞遊走能の亢進が関与していることを見出した。この結果は、環境汚染物質であるアルミニウムが抗がん剤に対する抵抗性獲得に関与しているということを示唆している。アルミニウムによって、抗がん剤誘導性細胞死が抑制されることを初めて明らかにした点は新規性があり、そのメカニズムとしてアルミニウムによるErkの活性化が関与していること明らかにした点は医学における学術的要素も高い。以上より本審査会は本論文を博士 (医学) の学位に十分値すると判断した。